

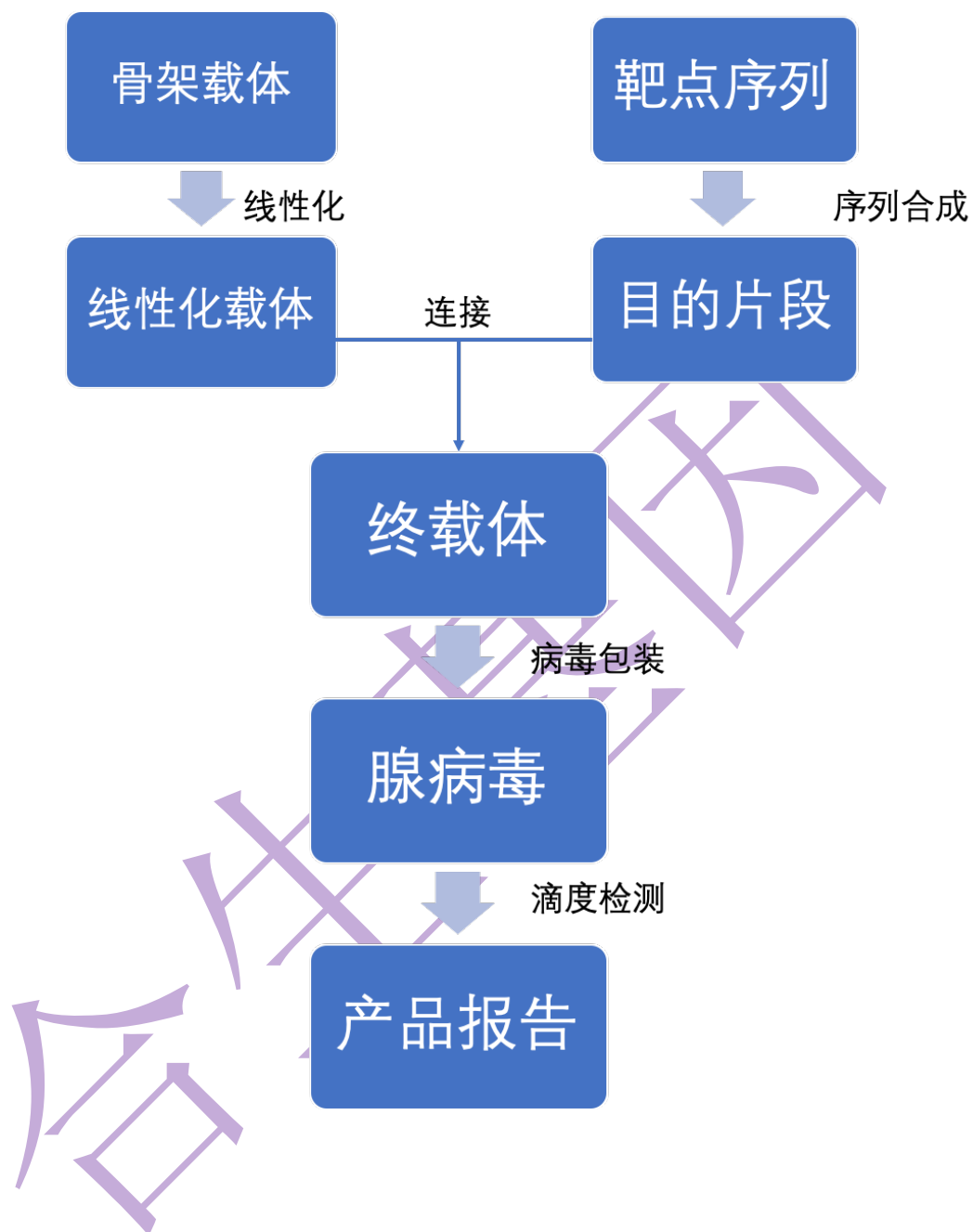
干扰腺病毒构建和包装手册

| | |
|-------------------------------|----|
| 1. 服务流程 | 3 |
| 2. 仪器与试剂 | 4 |
| 3. 构建实例 | 5 |
| 3.1. 基因干扰腺病毒载体构建 : | 5 |
| 3.1.1. 目的基因 | 5 |
| 3.1.2. 载体信息 | 5 |
| 3.1.3. 干扰载体图谱 (NC 序列) | 5 |
| 3.2. 质粒构建步骤 | 6 |
| 3.2.1. RNA 靶点设计 | 6 |
| 3.2.2. 载体酶切 | 6 |
| 3.2.3. 目的序列合成及退火 | 6 |
| 3.2.4. 退火产物与载体进行连接 | 7 |
| 3.2.5. 转化涂板 | 7 |
| 3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取 | 7 |
| 3.2.7. 质粒质控 (目的基因测序) | 7 |
| 3.2.8. 测序引物 | 8 |
| 4. 腺病毒包装 | 9 |
| 4.1. AD293 细胞准备 | 9 |
| 4.2. 腺病毒包装系统转染 | 9 |
| 4.3. 腺病毒收集及浓缩 | 10 |
| 4.4. 病毒质量检测 | 10 |

| | |
|--------------------|----|
| 4.4.1. 物理指标检测..... | 11 |
| 4.4.2. 无菌检测 | 11 |
| 4.4.3. 病毒滴度测定..... | 11 |



1. 服务流程



2. 仪器与试剂

表 1 主要仪器及生产商

| 仪器名称 | 生产厂家 |
|---------------------------------|--------------------|
| Sorvall Legend Mircro 17 台式离心机 | 美国 ThermoFisher 公司 |
| Sorvall ST 16R 冷冻离心机 | 美国 ThermoFisher 公司 |
| 微量移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 生物安全柜 | 新加坡 ESCO 公司 |
| EVOS 荧光显微成像系统 | 美国 ThermoFisher 公司 |
| 恒温二氧化碳细胞培养箱 | 德国 Binder 公司 |
| 实验室耗材 I (移液枪头、1.5/2.0 mL 离心管) | 美国 Axygen 公司 |
| 实验室耗材 II (细胞培养皿、移液管等) | 美国 Corning 公司 |
| 超低温冷冻冰箱 | 美国 ThermoFisher 公司 |
| 凝胶成像分析系统 | 北京赛智创业科技有限公司 |
| 凝胶电泳系统 | 美国 BioRad 公司 |

表 2 主要试剂及生产商

| 试剂名称 | 生产厂家 |
|-----------------------------|------------------------------|
| 质粒小量快速提取试剂盒 (离心柱型) | 北京艾德莱生物科技有限公司 |
| 限制性内切酶类 | 美国 NEB 公司/美国 ThermoFisher 公司 |
| DNA Ligase | 北京合生基因科技有限公司 |
| 腺病毒包装试剂盒 | 北京合生基因科技有限公司 |
| EpFect Transfection Reagent | 北京合生基因科技有限公司 |
| EvaGreen 2× Master Mix | 北京合生基因科技有限公司 |
| DMEM 高糖培养基 | 美国 Gibco 公司 |
| RPMI 1640 培养基 | 美国 Gibco 公司 |
| 胎牛血清 | 美国 Gibco 公司 |

3. 构建实例

以 RNAi 阴性对照靶点序列为例描述载体构建及腺病毒包装过程。

3.1.基因干扰腺病毒载体构建：

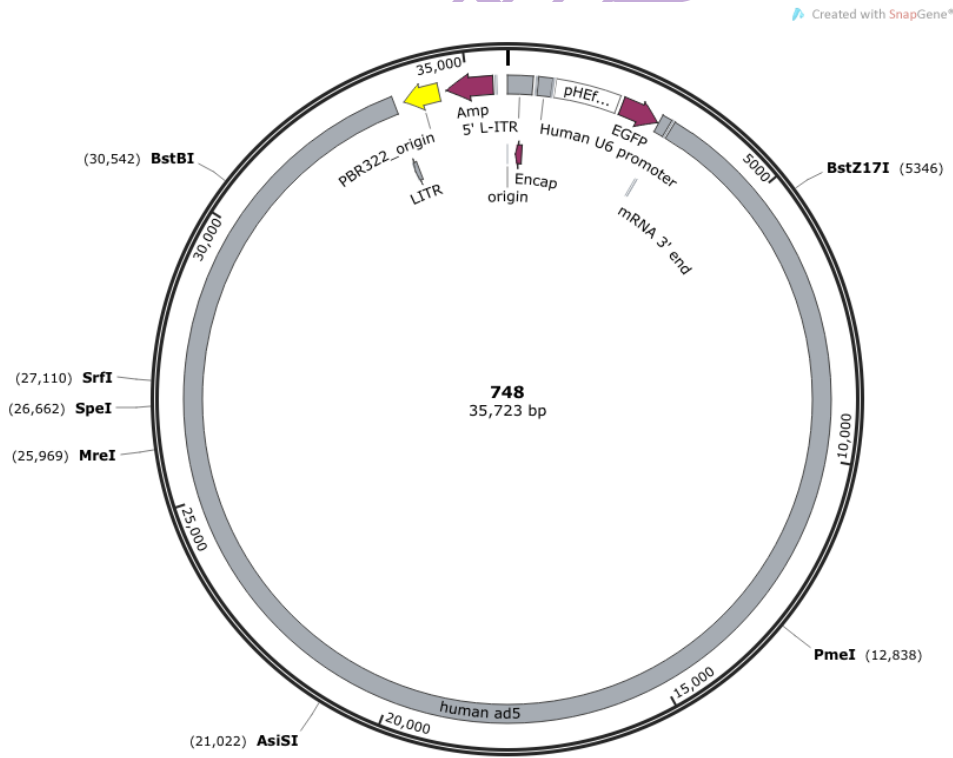
3.1.1. 目的基因

NC 序列

3.1.2. 载体信息

| | | |
|------|------------------------|------|
| 载体编号 | 载体元件 | 原核抗性 |
| XX | ADV-U6-shRNA-EF1α-EGFP | AMP |

3.1.3. 干扰载体图谱（NC 序列）



干扰腺病毒载体示例

3.2.质粒构建步骤

3.2.1. RNA 靶点设计

针对目的基因序列，遵循 RNAi 靶点设计原则，设计多个 RNAi 靶点序列，选择最优靶点构建目的载体。除了针对目的基因的靶点序列外，我们也使用一些无义序列作为 RNAi 阴性对照。另外，RNAi 靶点序列也可由客户提供，根据客户的需求构建在相应的载体上。

3.2.2. 载体酶切

酶切骨架载体，对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带：

酶切体系：

| | |
|---------------------------|-------------|
| 10x buffer | 2 μ L |
| 酶 1 | 1 μ L |
| 酶 2 | 1 μ L |
| Plasmid/product | 2~3 μ L |
| Add ddH ₂ O to | 20 μ L |

3.2.3. 目的序列合成及退火

根据目的序列及骨架载体序列，设计引物序列；先合成单链引物序列，然后退火成双链 DNA。

| | |
|--------------------|------------|
| ddH ₂ O | 14 μ L |
| 10×Buffer | 2 μ L |
| 100 μ M 正向引物 | 2 μ L |
| 100 μ M 反向引物 | 2 μ L |

反应程序为:95 $^{\circ}$ C 3 min ，95 $^{\circ}$ C 到 25 $^{\circ}$ C 缓慢冷却，例如 -1 $^{\circ}$ C/ 30 s

3.2.4. 退火产物与载体进行连接

| | |
|----------------------|-----------|
| 退火产物 | 1 μ L |
| 骨架载体 | 1 μ L |
| T4 ligase | 1 uL |
| 10× T4 ligase Buffer | 1 μ L |
| ddH ₂ O | 6 μ L |
| Total | 10 uL |

3.2.5. 转化涂板

连接后产物 5-10 μ L 转化至 100 μ L 感受态，42℃金属浴，热激 1 min, 冰上迅速预冷 2 min，在超净工作台中，加入 600 μ L 无抗培养基，37℃ 摇床振荡培养 1 h，取适量菌液涂布在含有相应抗生素的平板上，在恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。

3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取

挑选 3-4 个单菌落摇菌，加入相应抗性培养基摇菌过夜（8 mL LB 液体培养基），然后参照质粒抽提试剂盒进行质粒抽提。

3.2.7. 质粒质控（目的基因测序）

完成干扰腺病毒质粒构建后，针对目的基因序列测序，并比对鉴定，以获得构建正确的质粒。

基因干扰腺病毒载体信息

| 载体编号 | shRNA 序列 |
|------|--|
| NC | 5' -AAACGTGACACGTTCCGAGAA CGAA TTCTCCGAACGTGTCACGTTT -3' |

NC 载体测序结果：

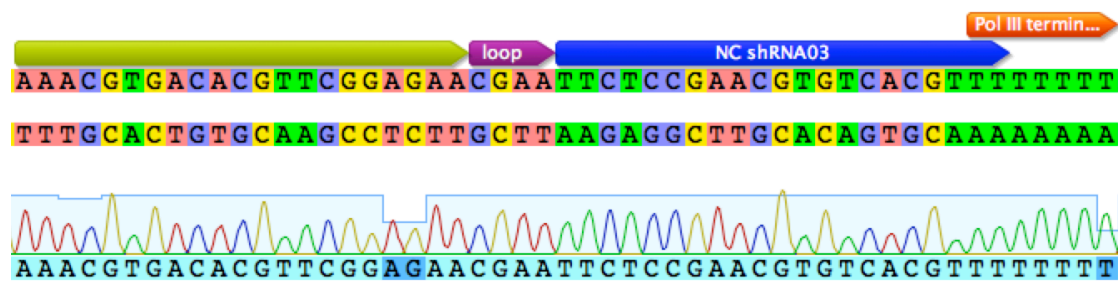
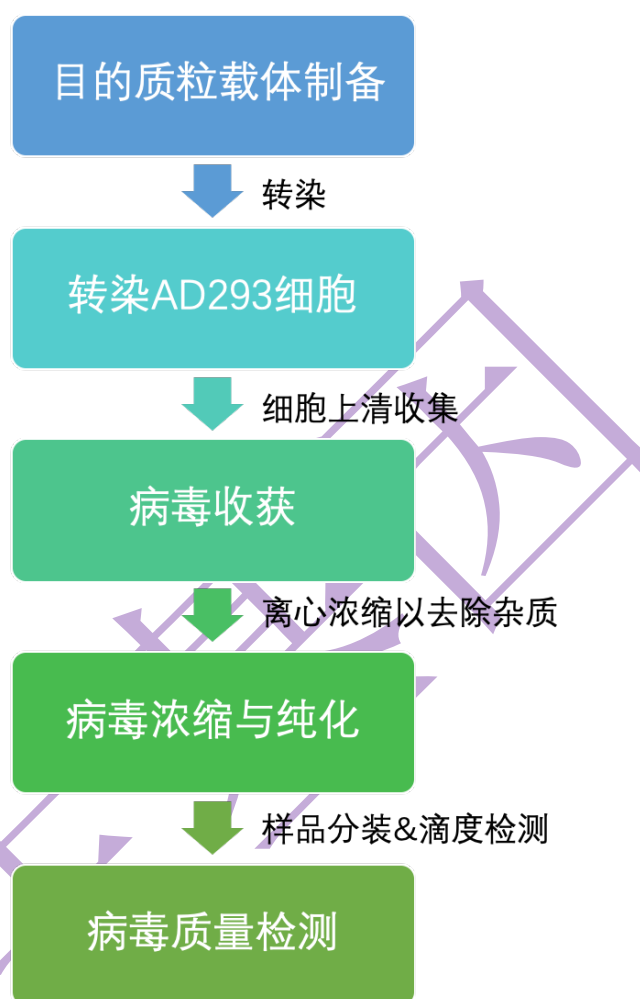


图 3.1.1 基因干扰腺病毒质粒测序比对结果

3.2.8. 测序引物

| 引物名称 | 序列 |
|-------|-----------------------|
| NC 质粒 | CAGGAAGAGGGCCTATTTCCC |

4. 腺病毒包装



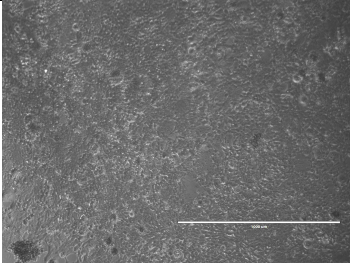
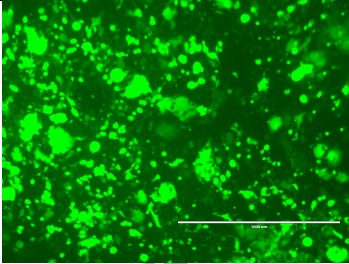
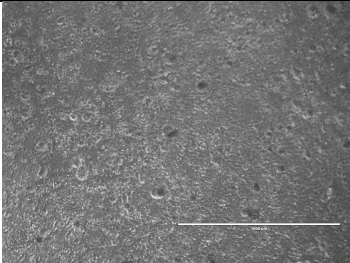
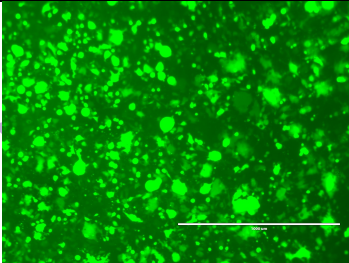
4.1. AD293 细胞准备

将 $3\sim5\times10^6$ 个 AD293 细胞传代接种至 100 mm 细胞培养皿中，置于 37 °C，5% CO₂ 的培养箱中，培养 16 h~24 h。传代过程中需要将细胞充分消化为单细胞悬液，以获得较好的包装效果。

4.2. 腺病毒包装系统转染

- 1) 将腺病毒骨架质粒线性化转染 AD293 细胞
- 2) 观察感染 72h 荧光表达情况。

干扰腺病毒包装过程中荧光表达情况示例

| 载体编号 | 白光 | 绿色荧光 |
|------|---|--|
| 干扰 |  |  |
| 对照 |  |  |

4.3. 腺病毒收集及浓缩

- 1) 7-10 天时观察 AD 293 细胞状态及出毒效率，将上清及细胞全部收集置于-80℃反复冻融 3 次；
- 2) 将冻融后的病毒悬液依次接种三次，接种量做梯度处理，分别收集 3-5 天细胞病变完全的感染组，置于-80℃反复冻融 3 次；
- 3) 用适量腺病毒悬液感染 AD 293 15 cm 培养皿，3-5 天待细胞病变完全收集病毒悬液置于-80℃反复冻融 3 次；
- 4) 5000 rpm 离心 10 min，弃细胞碎片，收集上清加 PEG 8000 浓缩过夜。12000 rpm 离心上述混合物 20 min，弃上清，将沉淀物悬浮在密度为 1.10 g / mL CsCl 溶液中；
- 5) CsCl 密度梯度离心，2,0000 rpm 离心 3h，收集密度在 1.30g / mL 和 1.40g / mL 之间的病毒于透析袋中，在透析缓冲液中 4℃过夜，中间换一次透析液。收集病毒，测定病毒滴度；

4.4. 病毒质量检测

腺病毒的质量控制要点包括物理状态检测、无菌检测及病毒滴度检测。

4.4.1. 物理指标检测

- 1) 颜色判定：通过肉眼判定，腺病毒保存液呈澄清液体状。
- 2) 粘稠度判定：用 20-200 μL 规格移液器缓慢吸取 50 μL 腺病毒保存液体，无明显粘稠感或吸液滞后现象；

4.4.2. 无菌检测

将病毒加入 293 细胞验证，正常培养 24 h 后镜检，无任何细菌及真菌污染情况，同时参照空细胞组，细胞间隙无明显颗粒存在，培养基澄清透明。

4.4.3. 病毒滴度测定

- 1) 选取状态良好的 AD 293 细胞，使用完全培养及重悬细胞，制备成 2.5×10^5 个 / mL 的细胞悬液，24 孔板每个孔中接种 1mL 细胞，37°C、5%CO₂ 培养 1 小时。
- 2) 准备好 10 倍梯度稀释的病毒样品，每孔空逐滴加入 30 μL 病毒样品。
- 3) 37°C、5% CO₂ 培养 2 天。
- 4) 轻轻去除培养液，艳 24 孔板侧壁缓慢加入预冷的甲醇 0.5mL，-20°C 固定 10 min。
- 5) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 6) 使用含 10% BSA 的 PBS 稀释 1000 \times anti-Hexon 抗体，每孔中添加 250 μL ，-37°C 孵育 1 小时。
- 7) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 8) 使用含 10% BSA 的 PBS 稀释 500 \times 辣根过氧化物酶标记的二抗，每孔中添加 250 μL ，-37°C 孵育 1 小时。
- 9) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 10) 加入 250 μL 新配置的 1 \times DAB 工作液至每孔，室温孵育 10 min。
- 11) 弃去 DAB，使用使用 1ml 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞。
- 12) 每孔随机选择 5 个视野，使用光学显微镜 10 \times 物镜下计算阳性细胞个数。

- 13) 计算没孔阳性细胞的平均个数和病毒滴度。
- 14) 计算显微镜下视野中阳性细胞的平均个数。选择一个梯度，此梯度视野中有 5-50 个阳性细胞，随机选择至少 5 个区域计数。
- 15) 计算 24 孔板中每孔视野的个数。对于多数显微镜 标准 10×目镜与 10×物镜所观察到的视野直径为 1.8mm，因此每个视野的面积= $3.14 \times (D/2)^2 = 3.14 \times 0.92 = 2.54 \text{ mm}^2$ 。
- 16) 对于一个标准 24 孔板，培养面积为 2.0 cm^2 ，因此每孔视野数= $2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ mm}^2 = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 = 79$ ，如果您不能确定您的物镜所观察到的视野直径或者您使用的不是 10×物镜，视野直径可用血球计数板来确定。

17) 滴度计算式

$$\text{Viral Titer} = \frac{(\text{average positive cells / field}) \times (79 \text{ fields / well}) \times \text{dilution factor}}{(0.03\text{mL})}$$

- 18) 本次实验在显微镜下 5 个视野中计算的阳性细胞平均数为 6.6，此孔病毒稀释了 10^6 倍，根据以上公式得出：

$$\text{病毒滴度} = \frac{6.6 \times 79 \times 10^6}{0.03} = 1.73 \times 10^{10} \text{ IFU/mL}$$